

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-066572

(43)Date of publication of application : 10.03.1998

(51)Int.Cl. C12N 9/99
A61K 35/78
A61K 38/55
A61K 38/55
C07K 1/18
C07K 14/81

(21)Application number : 08-245470

(71)Applicant : SHOWA SANGYO CO LTD

(22)Date of filing : 29.08.1996

(72)Inventor : YOSHIZAWA YASUKO
MITSUYOSHI SHINSUKE
FUJIKAWA YOKO

(54) PRODUCTION OF SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR OF HIGH PURITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a soybean trypsin inhibitor of high purity useful as a pharmaceutical material by using, as a starting material, an extract produced by extraction from soybean under specific conditions.

SOLUTION: This soybean trypsin inhibitor of high purity is obtained by processing soybean in an aqueous solvent of 5-20 times as much as the volume of the soybean by extraction at pH of 3.0-6.0 (preferably 4.0-5.0) for 10min to 5hr (preferably 30min to 2hr), and further by subsequent simple separation and purification processing of the extract, which is rich in soybean tripsin inhibitor and contains little quantity of impurities difficult to remove, such as ion exchange chromatography.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-66572

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月10日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/99			C 1 2 N 9/99	
A 6 1 K 35/78	ABE		A 6 1 K 35/78	ABE J
38/55			C 0 7 K 1/18	
	ADD		14/81	
C 0 7 K 1/18			A 6 1 K 37/64	

審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-245470	(71) 出願人	000187079 昭和産業株式会社 東京都千代田区内神田2丁目2番1号
(22) 出願日	平成8年(1996) 8月29日	(72) 発明者	吉澤 康子 千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業 株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	三吉 新介 千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業 株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	藤川 洋子 千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業 株式会社総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 長沼 要

(54) 【発明の名称】 高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 大豆に特定の抽出方法を施し、次いで、該抽出液から簡単に高純度の大豆トリブシンインヒビターを得る方法を提供すること。

【解決手段】 大豆の抽出処理物に分離精製手段を施して大豆トリブシンインヒビターを得る大豆トリブシンインヒビターの製造方法において、抽出処理が水性溶媒中、pH3.0～6.0で行われることを特徴とする高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大豆の抽出処理物に分離精製手段を施して大豆トリブシンインヒビターを得る大豆トリブシンインヒビターの製造方法において、抽出処理が水性溶媒中、 $\text{pH}3.0 \sim 6.0$ で行われることを特徴とする高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項2】 大豆の抽出処理物が、抽出液である請求項1記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項3】 大豆の抽出処理物が、抽出液から生成する沈殿物である請求項1記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項4】 大豆の抽出処理に用いる水性溶媒の量が、大豆の5～20倍量である請求項1乃至請求項3のいずれか一つに記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項5】 抽出処理が水性溶媒中、 $\text{pH}4.0 \sim 5.0$ で行われる請求項1乃至請求項4記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項6】 抽出処理が施される大豆が、低温脱脂大豆である請求項1乃至請求項5記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項7】 水性溶媒が、リン酸水溶液である請求項1乃至請求項6のいずれか一つに記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項8】 大豆トリブシンインヒビターが、クニッツ型トリブシンインヒビターである請求項1乃至請求項7のいずれか一つに記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項9】 分離精製手段が、単独の分離精製手段を含むものである請求項1乃至請求項8のいずれか一つに記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【請求項10】 分離精製手段が、イオン交換クロマトグラフィーで行われるものである請求項1乃至請求項9のいずれか一つに記載の高純度の大豆トリブシンインヒビターの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】大豆の抽出により大豆トリブシンインヒビターを製造する方法に関するものであるが、特に、大豆から特定の抽出方法により高純度の大豆トリブシンインヒビターを簡単に製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】大豆トリブシンインヒビターは、大別してクニッツ型とボーマン・パーク型の2種が存在する。前者は分子量20,100、等電点4.5でトリブシンおよびその類似酵素を阻害する。後者は分子量7,975、等電点4.2でトリブシン、キモトリブシンの双方

を阻害する。両インヒビターは酵素阻害の特異性が異なるため、生体内で異なる生理活性を示すことが知られている。クニッツ型トリブシンインヒビターはトリブシン、結晶カリクレイン、活性型第X因子等に抑制効果を有することが知られており、炎症性浮腫亢進抑制剤（特開平7-10772号公報）、癌性胸・腹水貯留抑制剤（特公平6-23113号公報）として利用できることが報告されている。また、ボーマン・パーク型トリブシンインヒビターは肥満細胞脱顆粒抑制剤として有効であることが報告されている（特公平5-86933号公報）。

【0003】そこで、これらのインヒビターを工業的に高純度で製造することが出来れば、医薬用原料として提供することが可能となるが、特にクニッツ型トリブシンインヒビターは酵素に対する特異性が高いことから、医薬品原料としての提供が望まれている。

【0004】トリブシンインヒビターを大豆から得る方法は種々報告されているが、そのいずれも、中性から微アルカリ性の水性溶媒、あるいは強酸による低 pH の水性溶媒で、場合によっては食塩等の塩を添加して主要蛋白画分を抽出し、得られるホエーからのインヒビターの分離は、等電点沈殿、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等の組み合わせにより行われている。

【0005】大豆トリブシンインヒビターの製造方法としては、例えば、次のような方法が報告されている。

【0006】① 丸大豆又は脱脂大豆を水又は温水で抽出した豆乳から酸又は塩で蛋白質を凝固、沈殿させて得られる大豆ホエーの pH を調節（5.0～8.5）して限外濾過膜で濃縮液を得、陰イオン交換体への吸着、塩濃度勾配による溶出により大豆トリブシンインヒビターを製造する方法（特開平6-145198号公報）。

【0007】② 脱脂大豆の弱アルカリ（ $\text{pH}7.5 \sim 8.0$ ）抽出液を酸沈殿（ $\text{pH}3.5 \sim 6.4$ ）させたホエーを出発原料として、大豆トリブシンインヒビターを製造する方法（J. Agric. Food Chem., 35, 967-971(1987)）。

【0008】③ 脱脂大豆の0.25N硫酸抽出液から大豆トリブシンインヒビターを製造する方法（J. Biochem., 62, 141-149(1967)）。

【0009】上記の従来法①又は②の出発原料は、大豆から水（ pH 無調整）又は弱アルカリ水（ $\text{pH}7.5 \sim 8.0$ ）抽出により得られる豆乳である。次の段階の酸処理は、不溶化する蛋白質を除くことが目的である。最初の豆乳調製段階では、なるべく多くの蛋白質を抽出しており、大豆子葉細胞中の蛋白構造体であるプロテインボデーは破壊されて、構成蛋白質は可溶化していると考えられる。

【0010】また、上記の従来法③では、大豆の硫酸（0.25N）抽出液から大豆トリブシンインヒビターが得られているが、この硫酸溶液は $\text{pH}1.0$ 前後と考

えられ、かなり強酸性の抽出条件であるから、上記の従来法①又は②と同じように、プロテインボデーの破壊が生起していると考えられる。

【0011】このように、従来の方法は、いずれも大豆のプロテインボデーを破壊して、蛋白質成分のほとんどを可溶化した後に精製を行うことから、不純物が多く、そのために多段階の操作が必要であったり、操作に長時間を要するために微生物の繁殖が起こりやすい等の問題点がある。また、不要な蛋白質が多いために起こると考えられる蛋白質成分の不安定化が操作を困難にし、回収率の大幅な低下の原因となっている。工業的な方法においては、十分な限外濾過濃縮を行うことで蛋白質の不安定化を防ぐことができるとしているが、この操作は長時間を要するために微生物の繁殖や、限外濾過濃縮時のせん弾力による失活が問題となる。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】従来のものは、中性付近から弱アルカリの条件又は強酸性の条件下で可溶化させた蛋白質をpH4.2付近の酸性条件で沈殿させて夾雑蛋白質を分離した後、ホエー中に残る蛋白質から目的とする大豆トリブシンインヒビターを得る方法であるが、このような方法では、蛋白質の抽出時のプロテインボデーの破壊等により、ホエー中には目的とする大豆トリブシンインヒビターの他に、まだ多くの不純物が残存するので、その後の精製には、特定の精製方法の組合せが必要となる等、ホエーからの大豆トリブシンインヒビターの分離には困難が伴っていた。

【0013】そこで、本発明は、大豆に特定の抽出処理を施し、次いで、該抽出液又はその抽出液から生成する沈殿物を出発原料として、簡単に高純度の大豆トリブシンインヒビターを得る方法を提供するものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】大豆蛋白質成分の等電点はpH4.0～6.0の範囲のものが多く、その溶解性はpH4.0～4.2で最も低くなるが、本発明者は、大豆蛋白質成分の溶解度が低く、しかも、トリブシンインヒビターそのものにとっても等電点付近に相当するpH、すなわち、pH3.0～6.0の条件下で抽出した抽出物に、意外にも大豆トリブシンインヒビターが多く含まれるとともに、除去困難な不純物が少ないことを知り、この抽出物を原料とすると、その後、高度な分離精製手段を組み合わせることなく、実質的には単独の分離精製手段を用いても高純度の大豆トリブシンインヒビターが得られることを見出し、本発明を完成した。

【0015】すなわち、本発明は、大豆に抽出処理を施し、次いで、得られる抽出液又はその抽出液を低温下で静置することにより生じる沈殿に分離精製手段を施して大豆トリブシンインヒビターを得る大豆トリブシンインヒビターの製造方法において、抽出処理が水性溶媒中、pH3.0～6.0で行われることを特徴とする高純度

の大豆トリブシンインヒビターの製造方法である。

【0016】本発明では、大豆の抽出時にプロテインボデーの破壊等が生起しないので、その分ホエー中の不純物の量が少なくなる、その結果、ホエーから簡単な分離手段により高純度の大豆トリブシンインヒビターを回収できる点で非常に優れた方法である。

【0017】大豆の抽出処理は、大豆に5～20倍容の酸溶液を加え、更に必要に応じて酸を加える等して、pHを3.0～6.0、好ましくは4.0～5.0に保ちながら、10分から5時間、好ましくは30分から2時間で抽出することによって行う。この際、必要に応じて30～60℃に加熱する。

【0018】抽出終了後、遠心分離又は加圧濾過等の手段で抽出液をホエーとして回収する。ここで得られる抽出液は、大豆主要蛋白質の含量が少ないためにその後の精製負荷が小さく、しかも、目的とする生理活性を持つトリブシンインヒビター成分が等電点に近いにもかかわらず、トリブシンインヒビターは大豆中の45～70%がホエー中に溶出する。

【0019】このホエーをそのまま、またはpHを中性域に調整後生じた沈殿を除去して分離精製処理に供することができる。この段階で限外濾過濃縮工程を組み入れることも可能であるが、この工程は必ずしも必要ではない。また、分離精製処理の前に除粒子工程、例えば、孔径0.1～0.45 μ mの濾過膜処理等を行って、除菌あるいは残存する粒子の除去を行うことができる。

【0020】さらに、先に得られたホエーまたはそれを限外濾過膜で適宜濃縮した液を2～15℃、好ましくは2～10℃にて2時間以上、好ましくは4～24時間静置することで生じる沈殿を遠心分離等により回収し、pH6.0～9.0の水性溶媒にて溶解、次いで、不溶物を遠心分離や濾過等により除去して得られた溶液を分離精製に供することもできる。溶解性を向上させるために、適当な濃度の塩類や、ドデシル硫酸ナトリウム、トリトンX-100等の界面活性剤、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール等の還元剤を添加することもできる。また、この際にも分離精製の前段階で上記と同様の除菌あるいは残存粒子の除去操作を行うことができる。

【0021】分離精製処理は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、限外濾過等の通常分離精製手段単独で行われるが、その場合、特にイオン交換クロマトグラフィーを採用するのが好ましい。なお、イオン交換クロマトグラフィーを採用した場合で展開剤の除去が必要になるときに行う展開剤除去処理は、ここにいう分離精製手段には入らないことは言うまでもない。通常は、単独の分離精製手段の採用で十分その目的を達成することが出来るが、より高度の純度のものを得ようとする場合には、他の分離精製手段を組み合わせることは勿論可能である。

【0022】大豆材料としては、丸大豆や低温脱脂大豆等を挙げることができるが、通常は植物油の製造工程で発生する低温脱脂大豆が大量かつ安価に入手できるので好ましい。

【0023】水性溶媒としては、無機酸や有機酸の溶液いずれも可能であるが、該酸は、特にリン酸や酢酸、クエン酸、乳酸等の弱電解質の酸が好ましい。

【0024】本発明によれば、ホエーをそのままイオン交換クロマトグラフィーに供することにより、トリプシンインヒビターまたはクニッツ型トリプシンインヒビターを単独で分離精製することが可能であり、両者を安定して純度90%以上に精製することができる。

【0025】大豆トリプシンインヒビターは、多くの大豆蛋白質成分が含まれるプロテインボデーではなく、その外の細胞質に局在するとされている (SMITH & CIRCLE 著「大豆タンパク質」建帛社 (1974)) が、プロテインボデーを破壊せずに細胞質のみから大豆トリプシンインヒビターを抽出することは行われていなかった。

【0026】このように、プロテインボデーを破壊せずに大豆の細胞質のみから大豆トリプシンインヒビターを抽出することは本発明が初めてであり、また、大豆抽出液中の分離困難な成分の存在等からみて、該抽出物から簡単な分離精製手段により高純度の大豆トリプシンインヒビターを得ることができることは予想外のことであり、このことは、本発明の特異性を窺わせる。

【0027】以上、本発明により、大豆に含まれる生理活性を持つ大豆トリプシンインヒビター成分を工業的に安定に高純度かつ安価に精製することが可能となり、大豆トリプシンインヒビターを医薬品原料として利用することが可能となった。

【0028】また、本発明の方法によれば、他のアルブミン成分も容易に高純度で得ることができる点においても、本発明は非常に価値がある。

【0029】なお、大豆をリン酸処理 (pH 4.7、50℃) する技術としては、特開平2-154646号公報、特開平4-173057号公報、特開平7-107974号公報等があるが、これらは、飼料用大豆 (特開平2-154646号公報、特開平4-173057号公報) やβ-アミラーゼ (特開平7-107974号公報) の製造に関するものであり、いずれも、トリプシンインヒビターを得ることを目的とするものではないので、トリプシンインヒビターを得る方法についての記載は全くないことからみて、これらは、本発明とは全く無関係のものである。

【0030】

【発明の実施の形態】以下、実施例により本発明の実施の態様を説明する。

【0031】なお、活性測定はp-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) を基質に用いるHummelの方法 (Can. J. Biochem. Physiol., 37, 1393 (1959))

に従ったトリプシンの活性測定法を用いて、1 unitのトリプシン活性を阻害する活性を1 unitとした。

【0032】

【実施例1】低温脱脂大豆粉100gに対して、0.2% (v/v) のリン酸水溶液1 lを添加して攪拌した後、pHを4.7に且つ温度を50℃に調整して、60分間抽出した。遠心分離 (8,800 x g、15分) して抽出液を回収した。

【0033】得られた大豆ホエー100mlをミリポア社製メンブレン濾過膜 (タイプGS; 孔径0.22 μm) で除菌濾過し、イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムはファルマシア製 DEAE-Sepharose FFを充填し (φ1.6×12 cm)、0.075 M食塩を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した後、試料を供し、平衡化に用いた緩衝液で洗浄後、0.075 Mと0.25 Mの食塩をそれぞれ含む緩衝液で直線的濃度勾配を作成して溶出し、溶出液を10 mlずつ分画した。得られた画分をSDS電気泳動に供し、クニッツ型トリプシンインヒビター溶出画分を合わせて、ファルマシア製PD-10カラムを用いて脱塩し、精製試料を得た。得られた精製試料は、SDS電気泳動でクニッツ型トリプシンインヒビターの単独バンド (純度98%以上) となり、総活性7,030 unitが得られた。

【0034】

【実施例2】低温脱脂大豆粉100gに対して、0.2% (v/v) のリン酸水溶液1 lを添加して攪拌した後、pHを4.7に且つ温度を50℃に調整して、60分間抽出した。遠心分離 (8,800 x g、15分) して抽出液を回収した。

【0035】得られた大豆ホエー100mlを、6 N水酸化ナトリウム溶液でpH 7.0に調整し、生じた沈殿を遠心分離して除去した後、ミリポア社製メンブレン濾過膜 (タイプGS; 孔径0.22 μm) で除菌濾過し、イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムはファルマシア製 DEAE-Sepharose FFを充填し (φ1.6×12 cm)、0.075 M食塩を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した後、試料を供し、平衡化に用いた緩衝液で洗浄後、0.075 Mと0.25 Mの食塩をそれぞれ含む緩衝液で直線的濃度勾配を作成して溶出し、溶出液を10 mlずつ分画した。得られた画分をSDS電気泳動に供し、クニッツ型トリプシンインヒビター溶出画分を合わせて、ファルマシア製PD-10カラムを用いて脱塩し、精製試料を得た。得られた精製試料は、SDS電気泳動でクニッツ型トリプシンインヒビターの単独バンド (純度98%以上) となり、総活性9,500 unitが得られた。

【0036】

【実施例3】低温脱脂大豆粉400gに対して、0.4% (v/v) のリン酸水溶液4 lを添加して攪拌した後、pHを4.0に且つ温度を50℃に調整して、90

分間抽出した。遠心分離（8, 800 x g、15分）して抽出液を回収した。

【0037】得られた大豆ホエー3.5Lを6N水酸化ナトリウム溶液でpH7.0に調整し、生じた沈殿を遠心分離して除去した。上清をミリポア社製メンブレン濾過膜（タイプGVLP；孔径0.2μm）で除菌濾過し、イオン交換クロマトグラフィーに供した。TSK Gel DEAE-トヨパール650Mを用い、φ8.9×15cmのカラムを作成し、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化した後、試料を供し、0.075M、0.25M、0.50Mの食塩をそれぞれ含む緩衝液で段階的に溶出した。0.25M食塩で溶出したトリブシンインヒビターを、ファルマシア製 Sephadex G-25を充填したカラムに供して脱塩した。

【0038】得られたトリブシンインヒビターは、SDS電気泳動でクニッツ型トリブシンインヒビターとボーマン・パーク型トリブシンインヒビターの混合物であり、トリブシンインヒビターとしての純度97%であった。得られた総活性1,730,000unitであった。

【0039】

【実施例4】低温脱脂大豆粉100gに対して、0.2%（v/v）のリン酸水溶液1lを添加して攪拌しながら、pHを4.7、温度を50℃に調整して90分間抽出し、遠心分離（8, 800 x g、15分）して抽出液を回収した。得られた抽出液を50℃に保持しながら限外濾過膜（NTU-3150；日東電工）を用いて10倍に濃縮し、濃縮液を4℃にて24時間静置した。生じた沈殿を遠心分離して回収し、50mlの0.01規定水酸化ナトリウム溶液に分散し、十分に攪拌した後、可溶画分を吸引濾過して回収した。得られた濾液をミリポ

抽出時のリン酸溶液添加量（l）
活性回収量（unit）

【比較例1】低温脱脂大豆100gに10倍量の蒸留水を加えて、30℃に保温して2時間抽出した。遠心分離をして抽出液を得、3N塩酸でpHを4.5に調整して生じた沈殿を再び遠心分離して除去した。得られたホエーをpH7.0に再度調整し、除菌濾過したのち実施例2と同様に陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、脱塩してトリブシンインヒビターを得た。得られたトリブシンインヒビターは、SDS電気泳動の結果、クニッツ型トリブシンインヒビターを含み、純度73%であった。

【0041】

【比較例2】低温脱脂大豆粉100gに対して、1.1%（v/v）のリン酸水溶液1.0lを添加して攪拌した後、pHを2.0に調整して、攪拌しながら室温で90分間抽出した。遠心分離（8, 800 x g、15分）して回収した抽出液を、6N水酸化ナトリウム溶液でpHを7.0に調整し、生じた沈殿を再び遠心分離して除去した。得られたホエーを除菌濾過した後、実施例2と

ア社製メンブレン濾過膜（タイプGS；孔径0.22μm）で除菌濾過した後、実施例2と同様の方法にてイオン交換クロマトグラフィーに供して精製クニッツ型トリブシンインヒビターを得た。得られた精製試料は、SDS電気泳動でクニッツ型トリブシンインヒビターの単独バンド（純度98%以上）となり、7,900unitが得られた。

【0040】

【実施例5】低温脱脂大豆粉100gに対して、0.27%（v/v）リン酸水溶液をそれぞれ、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0l添加してpHを4.5に保持しながら50℃にて60分間抽出した。遠心分離（8, 800 x g、15分）にてそれぞれ抽出液を回収し、4℃にて24時間保持した。生じた沈殿をデカンテーションにより分取し、50mlの0.01規定のNaOHを加えて分散した後、0.11規定の水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを8.0に調整し、可溶画分を遠心分離にて回収した。得られた溶液のpHを0.1規定の塩酸を用いて7.0に調整し、実施例2と同様に陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、脱塩してクニッツ型トリブシンインヒビターを得た。それぞれの抽出液から得られた精製試料の純度は、同等であった。回収率は、表に示したようにリン酸水溶液の添加量が1.0lで最も良好であった。添加量が0.5lよりも少なくなると、溶解度の関係でトリブシンインヒビターが十分に抽出されないものと考えられる。一方、添加量が2.0lを越えると、その後の操作におけるロスが大きくなり、処理量が多くなって操作が煩雑になるので実用的ではない。

0.2	0.5	1.0	2.0	3.0
3200	6500	7200	7000	5300

同様に陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、脱塩してトリブシンインヒビターを得た。得られたトリブシンインヒビターは、SDS電気泳動の結果、クニッツ型トリブシンインヒビターを含み、純度78%であった。

【0042】

【発明の効果】従来のものは、中性付近から弱アルカリの条件又は強酸性の条件下で可溶化させた蛋白質をpH4.2付近の酸性条件で沈殿させてホエー中に残る少量の蛋白質を分離した後、目的とする大豆トリブシンインヒビターを得る方法であるが、このような方法では、蛋白質の抽出時のプロテインボデーの破壊等により、ホエー中には目的とする大豆トリブシンインヒビターの他に、多くの不純物が残存するので、その後の精製には、特定の精製方法の組合せが必要となる等、ホエーから大豆トリブシンインヒビターの分離には困難が伴っていた。

【0043】これに対して、本発明では、大豆の抽出時にプロテインボデーの破壊等が生起しないので、その

(6)

分、ホエー中の不純物の量が少なくなる結果、ホエーから簡単な分離手段、すなわち、実質的に単独の分離精製手段より高純度の大豆トリプシンインヒビターを回収できる点で、本発明は非常に優れた方法である。

【0044】また、このように本発明によれば、ホエーをそのままイオン交換クロマトグラフィー等に供すると

いう簡単な操作により、トリプシンインヒビターまたはクニッツ型トリプシンインヒビターを単独で安定して純度90%以上に分離精製することができることは、取りも直さず、この両者が医薬の原料として価値が高いだけに、本発明の技術に対し高い評価をしたとしても当然である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

C 0 7 K 14/81

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 37/64

技術表示箇所

A D D